

## DETEKSI DAN QUANTIFIKASI BAKTERI PENGHASIL ENZIM FITASE DI SALURAN PENCERNAAN IKAN NILA (*Oreochromis niloticus*)

### DETECTION AND QUANTIFICATION OF PHYTASE-PRODUCING BACTERIA ASSOCIATED WITH THE GASTROINTESTINAL TRACT OF NILE TILAPIA (*Oreochromis niloticus*)

Muhamad Amin<sup>1\*)</sup>, Mita Ayu Liliyanti<sup>1)</sup>, Juwaidin<sup>2)</sup>, Husnawati<sup>1)</sup>, Hasnah<sup>3)</sup>

<sup>1)</sup>Program Studi Budidaya Perairan, Fakultas Perikanan, Universitas 45 Mataram, Jl. Imam Bonjol Tohpati, Cakranegara, Kota Mataram, Nusa Tenggara Barat, Indonesia

<sup>2)</sup>Laboratorium Mikrobiologi dan Bioteknologi, Fakultas Peternakan Universitas Mataram, Jl. Majapahit No. 62 Kota Mataram, NTB, Indonesia.

<sup>3)</sup>Balai Karantina ikan Pengendalian Mutu dan Keamanan hasil perikanan Mataram. Jl. Adi Sucipto, Ampenan Utara, Ampenan, Kota Mataram, NTB, Indonesia.

#### Abstrak

Penelitian ini bertujuan untuk mendeteksi dan mengkuantifikasi jumlah bakteri penghasil enzim fitase dari saluran pencernaan ikan nila. Ada dua jenis sample yang digunakan, yakni ikan yang dibudidayakan dan ikan liar. Hasil penelitian menunjukkan bakteri penghasil enzim fitase hanya dapat dideteksi dari saluran pencernaan ikan budidaya. Sedangkan, pada saluran pencernaan ikan nila liar tidak ditemukan adanya kelompok bakteri penghasil enzim tersebut. Dari total jumlah bakteri yang bersimbiosis dengan saluran pencernaan ikan nila budidaya ( $7.8 \times 10^7$  CFU/g), jumlah bakteri penghasil enzim fitase sebanyak  $2.6 \times 10^6$  CFU/g atau sekitar 3.31%. Hasil penelitian ini mengkonfirmasi adanya bakteri penghasil enzim fitase di saluran pencernaan ikan nila budidaya. Uji lanjut untuk mengetahui kuantitas enzim fitase yang dihasilkan di saluran pencernaan sangat diperlukan untuk mengetahui jumlah asam fitat maksimum yang dapat dicerna. Selain itu, bakteri tersebut harus diidentifikasi untuk dapat mengetahui sumbernya.

**Kata kunci :** Enzim fitase, probiotik, saluran pencernaan.

#### Abstract

Phytate content which is considered as anti-nutritional factors has been frequently associated with plant-based diets. One way to deal with this issue is by supplementation of exogenous phytase-producing bacteria. Thus, this study was aimed at detection and quantification of phytase-producing bacteria from the gastrointestinal tract of cultured Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) and wild tilapia. The result showed that phytase-producing bacteria were only detected from the gastrointestinal tract of cultured tilapia, while none was observed from the wild tilapia. Total viable count (TVC) of bacteria associated with the gastrointestinal tract of cultured Tilapia was recorded at  $7.8 \times 10^7$  CFU/g, and the number of phytase-producing bacteria were counted for  $2.6 \times 10^6$  CFU/g or about 3.31%. This research result indicated the presence of phytase-producing bacteria in the gastrointestinal tract of Nile tilapia. However, further research is still required to quantify the amount and activity of phytase in the intestinal tract of the fish. In addition, those phytase-producing bacteria should be identified in order to track where the bacteria came from.

**Keywords :** Phytase, probiotic, the gastrointestinal tract, tilapia

## Pendahuluan

Sumber protein alternatif sebagai pengganti tepung ikan terbaik saat ini adalah tepung kedelai. Disamping kandungan protein yang tinggi (46.59%) (Yamin & Palinggi 2016) serta profil asam aminonya yang cukup baik, (Kader *et al.* 2012; Storebakken 2000), tepung kedelai juga memiliki harga yang relatif lebih murah dari tepung ikan. Penggunaan tepung kedelai pada pakan telah dilaporkan di beberapa komoditas budidaya perairan dengan hasil yang signifikan seperti pada karpas (Sardar, Randhawa, Abid & Prabhakar 2007), timun laut (Liao, Ren, He, Han & Jiang 2015), dan udang (Azarm & Lee 2014; Ding, Zhang, Ye, Du & Kong 2015).

Namun, kendala utama yang masih dihadapi dalam penggunaan tepung kedelai adalah adanya kandungan asam fitat senyawa yang tergolong anti-nutrisikarena tidak dapat dicerna oleh ikan (Cho & Bureau 2001; Harland & Morris 1995; Reddy, Sathe & Salunkhe 1982; Al-Asheh & Duvnjak 1995). Pada saluran pencernaan ikan, senyawa tersebut cenderung aktif untuk mengikat protein dan mineral-mineral esensial (seperti kalsium, magnesium, besi dan seng). Akibatnya adalah rendahnya bioavailabilitas protein dan mineral, serta dapat menghambat kinerja enzim pencernaan (Pallauf & Rimbach 1997). Disamping itu, fitat juga telah dilaporkan mengurangi daya absorpsi usus ikan terhadap nutrisi, menyebabkan tingginya polusi lingkungan perairan (Conrad, Savchenko, Breves & Hofmeister 1996). Penelitian sebelumnya melaporkan bahwa asam fitat dapat dipecah oleh enzim yang disebut fitase, dikenal juga dengan mio-inositol heksakifosfat fosfohidrolase (Liener 1994; Sardar *et al.* 2007; Cao *et al.* 2008).

Beberapa penelitian sebelumnya melaporkan ikan tidak dapat mencerna asam fitat sehingga perlu penambahan enzim fitase untuk mengurangi dampak negatif asam fitat (Cho & Bureau 2001; Harland & Morris 1995; Reddy *et al.* 1982; Al-Asheh & Duvnjak 1995). Namun, penelitian lain juga ada yang menyebutkan bahwa terdapat beberapa jenis bakteri di saluran pencernaan ikan yang mampu menghasilkan enzim fitase. Oleh karena itu, penelitian ini bertujuan untuk mendeteksi dan mengkuantifikasi jumlah bakteri penghasil enzim fitase dari saluran pencernaan ikan nila.

## Metode Penelitian

### Ikan Sampel dan Pengambilan Usus

Pengambilan saluran pencernaan ikan sampel dilakukan menurut protokol yang dikembangkan oleh Amin (2016) dengan sedikit modifikasi. Secara ringkas, 15 ekor ikan nila dengan berat rata-rata  $2.52 \pm 0.70$  g dan panjang  $5.05 \pm 0.64$  cm dipelihara di akuarium dan dipuasakan selama 24 jam untuk membersihkan saluran pencernaannya. Ikan tersebut selanjutnya di bunuh dengan menusuk bagian kepala. Setelah ikan tidak bergerak, bagian ventral dibilas dengan 1% cairan iodine, dan usus diambil secara aseptik menggunakan pisau bedah steril. Usus ikan dihomogenisasi dengan mortar dan dicampur kedalam cairan fisiologis (1:9). Cairan yang sudah homogen tersebut kemudian dijadikan inokulum untuk kultur bakteri.

### Kultur Bakteri

Kultur bakteri dilakukan menurut protokol Ali *et al.* (2015) dengan sedikit modifikasi. Ringkasnya, cairan inokulum (homogenisasi usus) dilakukan 5 seri pengenceran (1:10). Kemudian 100  $\mu$ L sampel diambil dari setiap pengenceran dan dituang pada media TSA dan agar yang mengandung sodium fitat. Adapun komposisi media agar dengan kandungan fitat tersebut adalah; glukosa 10.0 g/L;  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  1.0 g/L; urea 10 g/L; asam sitrat 3.0 g/L; sodium citrate 2.0 g/L;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  1.0 g/L; sodium phytate 3.0 g/L; 1M Tris bufer (pH 8.0) 100mL/L;  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.1g/L; biotin 50 mg/L; thiamin-HCl 20mg/L; dan agar 15.0 g/L. Kemudian pH media diatur menjadi 7 sebelum disterilisasi. Medium agar yang sudah diinokulasi kemudian diinkubasi di suhu ruangan selama 48 jam secara aerobik. Koloni yang tumbuh pada kedua jenis agar dihitung untuk mendapatkan angka Lempel total (ALT) dan proporsi jumlah bakteri penghasil enzim fitase.

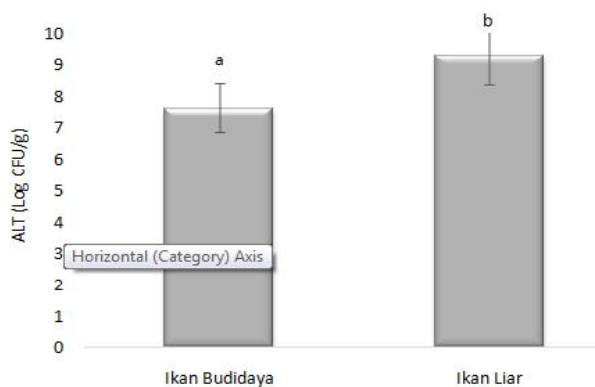
### Analisis Data

Data tentang jumlah bakteri di saluran pencernaan ikan yang hidup di lingkungan berbeda akan di analisa dengan t-test dengan bantuan aplikasi SPSS.

## Hasil

### Jumlah Bakteri di Saluran Pencernaan Ikan Liar dan Ikan Budidaya

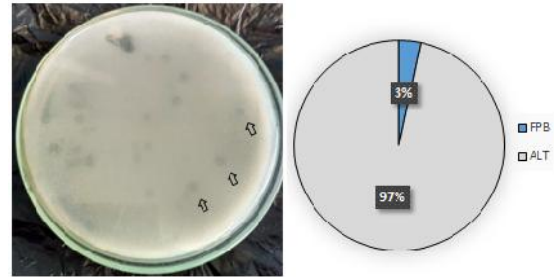
Hasil uji angka lempeng total (ALT) menunjukkan bahwa jumlah bakteri yang bersimbiosis dengan ikan nila yang hidup liar lebih banyak dibandingkan dengan ikan yang dibudidayakan di kolam,  $t=2.19, df=14, p=0.046$ . Rata-rata jumlah bakteri yang bersimbiosis dengan ikan liar tercatat sebesar 9.09 log unit. Sedangkan jumlah bakteri yang bersimbiosis dengan usus ikan budidaya sebesar 7.99 log unit (Gambar 1).



Gambar 1. Jumlah bakteri yang bersimbiosis dengan saluran pencernaan ikan nila yang hidup di kolam budidaya dan saluran pencernaan ikan nila yang hidup liar. Superscript berbeda pada gambar menunjukkan bahwa jumlah bakteri (ALT) pada saluran pencernaan ikan budidaya dan ikan liar berbeda secara signifikan,  $p<0.05$ .

### Bakteri Penghasil Enzim Fitase

Dari jumlah tersebut, persentase jumlah bakteri penghasil fitase yang dapat dideteksi dari saluran pencernaan ikan budidaya sebanyak  $2.5 \times 10^6 \pm 4.0 \times 10^2$  CFU/g atau  $6.41 \pm 0.07$  log unit CFU/g atau sekitar 3.31%, Gambar 2. Namun, keberadaan bakteri penghasil enzim fitase tersebut ditemukan hanya pada ikan budidaya. Sedangkan, pada saluran pencernaan ikan nila liar tidak ditemukan bakteri penghasil fitase.



Gambar 2. Proporsi bakteri penghasil enzim fitase terhadap angka lempeng total disaluran pencernaan ikan budidaya. Tanda panah menunjukkan koloni bakteri yang membentuk zona clearance sebagai indikasi adanya aktifitas enzim fitase. FPB adalah proporsi bakteri penghasil enzim fitase, dan ALT adalah jumlah bakteri yang bersimbiosis dengan saluran pencernaan ikan nila.

## Pembahasan

Beberapa penelitian sebelumnya menyebutkan bahwa hewan monogastrik seperti ikan tidak mampu mensekresi enzim fitase sehingga tidak dapat mengurai asam fitat, senyawa antinutrisi yang banyak terdapat pada pakan dengan sumber protein dari tanaman (Kumar Singh, Kumar Joshi & Kishor Gupta 2013; Roy, Mondal & Ray 2009). Olehkarenanya, keberadaan asam fitat di pakan sering kali dilaporkan menyebabkan daya cerna pakan menjadi rendah, pertumbuhan ikan lambat dan juga meningkatkan limbah buangan ke lingkungan perairan (Ai *et al.* 2007). Literatur lain menyebutkan bahwa dampak negatif asam fitat dapat diatasi dengan suplementasi enzim fitase atau bakteri penghasil fitase. Akan tetapi, suplementasi enzim maupun bakteri tidak selalu memberikan hasil yang positif dikarenakan berbagai faktor seperti karakter enzim maupun bakteri yang sangat peka dengan perubahan kondisi lingkungan khususnya suhu tinggi pada proses pembuatan pakan. Ai *et al.* (2007) misalnya melaporkan bahwa suplementasi enzim fitase melalui pakan tidak memberikan efek yang signifikan terhadap daya cerna pakan dan pertumbuhan ikan kakap.

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa ada bakteri penghasil enzim fitase yang hidup di saluran pencernaan ikan, meskipun hanya

3% dari total bakteri yang ada. Proporsi bakteri yang ditemukan pada penelitian ini sedikit lebih rendah dari proporsi bakteri penghasil enzim fitase pada saluran pencernaan ikan nila yang dilaporkan pada penelitian sebelumnya. Roy *et al.* (2009) misalnya melaporkan bahwa proporsi bakteri penghasil enzim fitase yang dideteksi dari saluran pencernaan ikan nila adalah 4%. Namun hasil penelitian ini juga lebih tinggi dari jumlah bakteri penghasil enzim fitase di saluran pencernaan nila yang hanya 1.3% (Khan & Ghosh 2012). Adanya perbedaan angka tersebut kemungkinan disebabkan oleh ukuran ikan sampel yang digunakan. Khan & Ghosh (2012) menggunakan ikan nila dengan berat rata-rata 22.33 gr dan panjang rata-rata 9.34 cm. Roy *et al.* (2009) bahkan menggunakan ikan nila yang jauh lebih besar yakni berat rata-rata 89 gr dan panjang rata-rata 13.6 cm. Sedangkan ikan nila yang digunakan pada penelitian ini memiliki berat rata-rata hanya  $2.52 \pm 0.70$  gr dan panjang 5.05 cm. Selain itu, perbedaan yang ada juga dapat disebabkan oleh kondisi lingkungan ikan sampel.

Hasil penelitian ini dan penelitian sebelumnya menunjukkan bahwa adanya sejumlah bakteri penghasil enzim fitase yang hidup di dalam saluran pencernaan ikan nila. Persamaan penelitian ini dan penelitian sebelumnya tersebut adalah adanya bakteri penghasil enzim fitase yang hidup di saluran pencernaan ikan nila. Hal ini mengindikasikan bahwa pendekatan lain seperti aplikasi probiotik, suplementasi nutrisi yang dibutuhkan oleh kelompok bakteri tersebut, sangat memungkinkan untuk dilakukan

### Kesimpulan

Hasil penelitian ini menunjukkan adanya bakteri penghasil enzim fitase yang hidup di saluran pencernaan ikan nila budidaya. Hasil lainnya menunjukkan bahwa keberadaan bakteri penghasil enzim fitase tidak dapat dideteksi dari saluran pencernaan ikan nila yang hidup liar. Jumlah bakteri penghasil enzim fitase sebanyak  $2.6 \times 10^6$  CFU/g atau sekitar 3.31%. Penelitian lebih lanjut tentang aktifitas enzim fitase di saluran pencernaan ikan nila sangat direkomendasikan untuk mengetahui kapasitas mencerna asam lemak.

### Ucapan Terima Kasih

Penulis mengucapkan banyak terimakasih kepada Kementerian Riset, Teknologi dan Pendidikan Tinggi (Kemenristekdikti) atas supportnya dalam bentuk pendanaan melalui skema Penelitian Dosen Pemula (PDP) tahun anggaran 2018.

### Daftar Pustaka

- Ai, Q., Mai, K., Zhang, W., Xu, W., Tan, B., Zhang, C., & Li, H. (2007). Effects of exogenous enzymes (phytase, non-starch polysaccharide enzyme) in diets on growth, feed utilization, nitrogen and phosphorus excretion of Japanese seabass, *Lateolabrax japonicus*. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 147, 502-508. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.cbpa.2007.01.026>
- Al-Asheh, S., & Duvnjak, Z. (1995). The effect of phosphate concentration on phytase production and the reduction of phytic acid content in canola meal by *Aspergillus carbonarius* during a solid-state fermentation process. *Applied microbiology and biotechnology*, 43, 25-30.
- Ali, M., Depamede, S. N., Setyono, B. D., Mukhlis, A., Amin, M., & Ashari, M. (2015). Stirred bioreactor for the robustness production of recombinant gst. Vp28 in fed-batch cultivation of *Escherichia coli*. *Scientific Study & Research. Chemistry & Chemical Engineering, Biotechnology, Food Industry*, 16, 245.
- Amin, M. (2016). Screening of Cellulose-Degrading Bacteria Associated with Gastrointestinal Tract of Hybrid Abalone as Probiotic Candidates. *International Journal of Aquaculture*, 6. doi:10.5376/ija.2016.06.0010
- Azarm, H. M., & Lee, S. M. (2014). Effects of partial substitution of dietary fish meal by fermented soybean meal on growth performance, amino acid and biochemical parameters of juvenile black sea bream *Acanthopagrus schlegelii*. *Aquaculture Research*, 45, 994-1003.
- Cao, L., Yang, Y., Wang, W., Yakupitiyage, A., Yuan, D., & Diana, J. (2008). Effects of pretreatment with microbial phytase on phosphorous utilization and growth

- performance of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquaculture Nutrition*,14, 99-109.
- Cho, C., & Bureau, D. (2001). A review of diet formulation strategies and feeding systems to reduce excretory and feed wastes in aquaculture. *Aquaculture research*,32, 349-360.
- Conrad, B., Savchenko, R. S., Breves, R., & Hofemeister, J. (1996). A T7 promoter-specific, inducible protein expression system for *Bacillus subtilis*. *Molecular and General Genetics* MGG,250, 230-236.
- Ding, Z., Zhang, Y., Ye, J., Du, Z., & Kong, Y. (2015). An evaluation of replacing fish meal with fermented soybean meal in the diet of *Macrobrachium nipponense*: growth, nonspecific immunity, and resistance to *Aeromonas hydrophila*. *Fish & shellfish immunology*,44, 295-301.
- Harland, B. F., & Morris, E. R. (1995). Phytate: a good or a bad food component? *Nutrition Research*,15, 733-754.
- Kader, M. A., Bulbul, M., Koshio, S., Ishikawa, M., Yokoyama, S., Nguyen, B. T., & Komilus, C. F. (2012). Effect of complete replacement of fishmeal by dehulled soybean meal with crude attractants supplementation in diets for red sea bream, *Pagrus major*. *Aquaculture*,350–353, 109-116. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2012.04.009>
- Khan, A., & Ghosh, K. (2012). Characterization and identification of gut-associated phytase-producing bacteria in some fresh water fish cultured in ponds. *Acta Ichthyol Piscat*,42, 37-45. doi:<http://dx.doi.org/10.3750/AIP2012.42.1.05>
- Kumar Singh, N., Kumar Joshi, D., & Kishor Gupta, R. (2013). Isolation of phytase producing bacteria and optimization of phytase production parameters. *Jundishapur Journal of Microbiology*,6, 1-6.
- Liao, M., Ren, T., He, L., Han, Y., & Jiang, Z. (2015). Optimum dietary proportion of soybean meal with fish meal, and its effects on growth, digestibility, and digestive enzyme activity of juvenile sea cucumber *Apostichopus japonicus*. *Fisheries Science*,81, 915-922. doi:<http://dx.doi.org/10.1007/s12562-015-0916-1>
- Liener, I. E. (1994). Implications of antinutritional components in soybean foods. *Critical Reviews in Food Science & Nutrition*,34, 31-67.
- Pallauf, J., & Rimbach, G. (1997). Nutritional significance of phytic acid and phytase. *Archives of Animal Nutrition*,50, 301-319.
- Reddy, N., Sathe, S., & Salunkhe, D. (1982). Phytates in legumes and cereals. *Advances in food research*,28, 1-92.
- Roy, T., Mondal, S., & Ray, A. K. (2009). Phytase-producing bacteria in the digestive tracts of some freshwater fish. *Aquaculture Research*,40, 344-353. doi:DOI 10.1111/j.1365-2109.2008.02100.x
- Sardar, P., Randhawa, H., Abid, M., & Prabhakar, S. (2007). Effect of dietary microbial phytase supplementation on growth performance, nutrient utilization, body compositions and haemato biochemical profiles of *Cyprinus carpio* (L.) fingerlings fed soyprotein based diet. *Aquaculture Nutrition*,13, 444-456.
- Storebakken, T. (2000). Soy products as fat and protein sources in fish diets for intensive aquaculture. *Soy in animal nutrition*.
- Yamin, M., & Palinggi, N. N. (2016). Aktivitas enzim protease dan kondisi pencernaan di usus ikan kerapu macam (*Epinephelus fuscoguttatus*) setelah pemberian pakan. *Jurnal Riset Akuakultur*,2, 281-288.